

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620131152518

UDC _____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

温敏核不育小麦可育和不育花药发育中钙离子的分布特征

The Distribution Characteristic of Calcium during the
Development of Fertile and Sterile Anthers of
Thermo-Sensitive Genic Male-Sterile Wheat

高凯

指导教师姓名: 田惠桥 教授

专业名称: 发育生物学

论文提交日期: 2016 年 05 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博士论文摘要库

摘 要	I
Abstract	III
第一章 前 言	1
1 被子植物花药发育的一般过程	1
1.1 被子植物雄配子体的发育	2
1.2 被子植物花药壁的发育	3
2 植物雄性不育的类型	3
2.1 依据基因型差异分类	4
2.2 依据败育花粉形态特征和败育时期分类	4
2.3 依据基因来源引起花粉败育类型（自交不亲和系）	5
3 植物雄性不育的研究进展	5
3.1 花粉败育时期的研究	5
3.2 花药结构与雄性不育的关系	6
3.3 营养物质的转运与雄性不育的关系	8
4 花药发育中 Ca^{2+} 功能及与雄性不育的研究	10
4.1 植物细胞中钙的特征与类型	10
4.2 植物细胞中有关 Ca^{2+} 的研究方法	10
4.3 花药发育中 Ca^{2+} 功能及与雄性不育的关系	11
5 研究目的	14
第二章 材料与方	15
1 材料	15
2 实验器材和设备	15
3 实验试剂	15
4 实验方法	17
4.1 压片法确定花药发育时期	18
4.2 材料的包埋流程	18

4.3 电镜制样操作流程	19
第三章 结果与分析	20
1 可育花药发育过程中钙的分布特征	20
1.1 造孢细胞时期	20
1.2 小孢子母细胞时期	20
1.3 小孢子发育早期	21
1.4 小孢子发育晚期	22
1.5 二胞花粉时期	23
1.6 成熟花粉时期	24
2 不育花药发育过程中钙的分布特征	25
2.1 小孢子发育早期	25
2.2 小孢子发育晚期	25
2.3 二胞花粉时期	26
2.4 成熟花粉时期	26
图版及图版说明	28
第四章 讨论	54
1 可育花药发育中钙的分布特征及其功能	54
2 不育花药发育中钙的异常分布及其影响	55
3 植物液泡发生及功能	57
参考文献	59
致谢	64

Contents

Abstract	I
English Abstract	III
Chaper 1 Introduction	1
1 The general development process of Anther	1
1.1 The development of male gametophytes.....	2
1.2 The development of anther wall.....	3
2 The types of plant male sterility	3
2.1 Classification based on genotypic difference	4
2.2 Classification based on pollen abortion morphology and abortion stage...4	
2.3 Classification based on way to nucleoplasm gene interactions and way to cause pollen abortion.....	5
3 The research in plant male sterility	5
3.1 Stage of pollen abortion.....	5
3.2 Relations between the anther structure and the plant male sterility.....	6
3.3 Relations between the transportation of nutrition and the plant male sterility8	
4 The research of the function of Ca^{2+} and male sterility	10
4.1 The distribution and type of Ca^{2+} in plant cells	10
4.2 Research methods for intracellular Ca^{2+}	10
4.3 The function of Ca^{2+} in anther development and the relations with male sterility.....	11
5 The purpose of this study	14
Chapter 2 Material and Methods	15
1 Material	15
2 Apparatus and equipments	15
3 Reagents	15
4 Methods	17

4.1 Determining the anther development period by squashing method	18
4.2 The embedding process.....	18
4.3 Electron microscopy sample preparation	19
Chapter 3 Results and Analysis	20
1 The distribution of Ca^{2+} during the development of fertile anthers	20
1.1 The stage of sporogenous cell	20
1.2 The stage of microspore mother cell.....	20
1.3 The stage of early microspore	21
1.4 The stage of late microspore.....	22
1.5 The stage of bicellular pollen.....	23
1.6 The stage of mature pollen.....	24
2 The distribution of Ca^{2+} during the development of sterile anthers	25
2.1 The stage of early microspore	25
2.2 The stage of late microspore.....	25
2.3 The stage of bicellular pollen.....	26
2.4 The stage of mature pollen.....	26
Figures and Explanation	28
Chapter 4 Discussions	54
1 The distribution of Ca^{2+} and its function during the development of fertile anthers	54
2 The distribution of Ca^{2+} and its affection during the development of sterile anthers	55
3 The occurrence and its function of the vacuole	57
Reference	59
Acknowledgement	64

摘 要

被子植物花药发育是一个复杂的过程,由许多环节组成。每一环节出现异常都将导致花粉败育。在被子植物中,雄性不育是一种常见现象,在杂种优势利用中具有很大潜力。 Ca^{2+} 是植物生长发育过程中的必需元素,具有重要的生理功能。它在植物生长发育过程中在体内特定的时间和空间以特定的分布形式参与调控植物体内许多生理活动。已有研究证明 Ca^{2+} 在植物花粉发育中具有特殊的生理功能,参与对花粉发育的调控。在败育花粉中, Ca^{2+} 呈现异常分布,显示与花粉败育有关。因此,从 Ca^{2+} 在花药发育过程中的分布特征探讨其生理功能以及与雄性不育原因的关系是一个新的研究领域。本实验以温敏核不育小麦百农不育系(Bainong sterility, BNS)的可育和不可育花药为材料,采用钙-焦锑酸钾沉淀技术研究可育花药发育和不育花药中 Ca^{2+} 分布特征的差异,探索可育花药发育中 Ca^{2+} 的生理功能和不育花药的花粉败育原因。主要实验结果如下:

1. 花药结构的变化

通过对可育和不育花药各个时期结构的比较,发现在该种雄性不育小麦的花药在发育到二胞花粉之前,两种花药的结构并没有明显差异。而到二胞花粉早期时,不育花药的花粉结构开始出现异常:首先,可育花粉到二胞时期时营养细胞中的大液泡分解并开始积累营养物质—淀粉。而不育二胞花粉中营养细胞中大液泡并没有逐渐分解消失,而是形成一些自体吞噬泡,使二胞花粉中的大液泡持续保留,最终败育。因此,该种温敏核不育小麦发生败育的时间是在二胞花粉早期,是营养细胞中大液泡分解环节发生异常,最终导致花粉败育。

2. 钙离子分布特征

通过钙-焦锑酸钾沉淀技术研究了可育和不育花药发育过程中 Ca^{2+} 的分布变化,通过 Ca^{2+} 的分布特征结合花药发育的生物学事件探索 Ca^{2+} 的生理功能和与花粉败育的关系。发现在可育花药发育过程中 Ca^{2+} 的分布特征:在造孢细胞时期,表皮和药室内壁细胞高度液泡化,大液泡中有较多钙沉淀颗粒。而中层和绒毡层细胞中还未液泡化,细胞质中钙沉淀颗粒较少,此时造孢细胞中钙沉淀颗粒也较

少。到小孢子母细胞时期,表皮、药室内壁和中层细胞中的钙沉淀颗粒开始减少,但细胞质内液泡化程度加深,推测 Ca^{2+} 的减少可能与这三层药壁细胞液泡化程度加深有关。绒毡层细胞中很少有明显的液泡,在其内切向壁、径向壁和细胞质中聚集较多的钙沉淀颗粒。显示出此时由体内转运的 Ca^{2+} 已到达绒毡层并由其转运到药室中。此时小孢子母细胞中钙沉淀颗粒依然较少。在四分体时期,药壁细胞中的钙沉淀颗粒没有明显变化,但在四分体胼胝质壁中钙沉淀颗粒增加。到小孢子早期,药壁细胞液泡内的钙沉淀颗粒明显减少,但在绒毡层细胞的内外切向壁、径向壁以及细胞质中聚集着较多的钙沉淀颗粒,推测绒毡层细胞中钙沉淀颗粒的增加可能与此时小孢子 Ca^{2+} 需求量增加有关。另外,绒毡层细胞中的 Ca^{2+} 增加可能作为绒毡层细胞退化的信号。早期小孢子花粉外壁和小孢子细胞质中钙沉淀颗粒逐渐增多,并特异性的聚集在小液泡中。到小孢子晚期,药壁细胞中的钙沉淀颗粒数目进一步减少,绒毡层已经退化的残迹中有一些钙沉淀颗粒。小孢子细胞质中出现许多小液泡,小液泡的液泡膜上特异分布着较多钙沉淀颗粒。随后小液泡融合成大液泡。这些特征暗示着 Ca^{2+} 与大液泡的形成有关。在二胞花粉期,药壁细胞中的钙沉淀颗粒减少。二胞花粉内营养细胞中的大液泡分解成许多小液泡,在这些小液泡内部和膜上又出现许多钙沉淀颗粒,显示出大液泡的分解也与 Ca^{2+} 有关。二胞花粉外壁表面也有较多钙沉淀颗粒。开花时,成熟花粉外壁表面和萌发孔处都积累了大量钙沉淀颗粒,但花粉内部的细胞质中钙沉淀颗粒明显减少。

在不育花药中,从造孢细胞时期到小孢子发育早期钙沉淀颗粒的分布特征与可育花药相比没有明显差异。到不育小孢子晚期时,钙沉淀颗粒出现明显异常:首先,晚期小孢子花药药壁细胞中的钙沉淀颗粒比可育花药中数量明显增多。其次,晚期不育小孢子细胞质、细胞核中也都异常积累较多钙沉淀颗粒。到二胞花粉时期,花粉中营养细胞的大液泡不分解,花粉细胞质中也不积累淀粉粒。在花粉细胞质和花粉壁中只有很少钙沉淀颗粒。开花时,在败育花粉内部没有积累营养物质—淀粉,细胞质中仍然有大液泡和一些自体吞噬泡。

关键词: 温敏核小麦; 花药发育; 钙离子

Abstract

The development of the anther in the higher plant is a complex process. It consists of many links. Each link which takes place abnormally will lead to the pollen abortion. Male sterility is a common phenomenon in higher plants, it has great advantages in hybridization utilization. Calcium is an indispensable element during plant growth and development, and has many important physiological functions. It participates in regulating many physiological processes as a particular form in specific time and space during plant growth and development. Studies have proved that Ca^{2+} has special physiological functions in pollen development. Ca^{2+} presents abnormal distribution in the sterile pollen, displaying it related to the pollen sterility. So, the study of Ca^{2+} distribution characteristics in the developing anther is a research direction to explore the relationship between physiological function and the mechanism of male sterility. In this research, we take fertile and sterile anthers of thermo-sensitive genic male-sterile wheat (*Triticum aestivum* L.) as experimental materials, use calcium-potassium antimonate deposition to characterize the differences of the Ca^{2+} distribution in the development of fertile and sterile anthers to explore the mechanism of male sterility. The results were as follows:

1 Structural changes of the anther

Comparing the structure of fertile and sterile anthers using light microscopy, we found that there was no difference before the bicellular pollen stage. But when pollen grains reach to the early bicellular stage, the structure of the anther began to appear abnormal in the sterile anther: Firstly, nutrients--starches were accumulated at the bicellular pollen stage in the fertile anther, but no starches accumulated in the sterile pollen at the same time; Secondly, the large vacuole in the vegetative cell in the sterile anther didn't decompose and disappear like in the fertile anther, although it also has some small vacuoles in the vegetative cell, but these small vacuoles are formed by the way of autophagy. This situation was obviously different from the fertile pollen.

Finally the large vacuole remained retain in the sterile pollen. Therefor, the pollen abortion occurs in the bicellular stage in this thermo-sensitive genic male-sterile wheat, and there are something wrong taking place during large vacuole decomposition process.

2 Distribution of Ca^{2+}

Calcium distribution in the fertile and sterile anthers were tested using potassium antimonite, The distribution of Ca^{2+} during the development of fertile anthers were as follows: At the sporogenous cell stage, more calcium precipitates appeared in the epiderm and endothecium cells, few calcium precipitates in the small vacuoles of cytoplasm of the tapetum cell, and there is few calcium precipates distributed in sporangiate and sporogenous cells. At the stage of microspore mother cell, Calcium precipitates of the anther wall began to decrease. But at the same time the calcium precipates appeared in the Intercellular space, suggesting that the decrease of Ca^{2+} may be related to the highly vacuolized of these cells of three anther wall. More calcium precipates were found in the tapetum cell, showing that the transport of calcium in the body has reached the tapetum. In the meantime, there is few calcium precipates in the microspore mother cell. At the stage of early microspore, Ca^{2+} precipitates of the anther wall reduced significantly, but more the precipitates accumulated in the the inner tangential wall、radial wall and the cytoplasm of the tapetum cell, speculating that the increase of calcium precipitates in tapetal cells may be associated with an increased demand of Ca^{2+} of microspore at this time, or was associated with the degradation of tapetum cell. At this stage, Calcium precipitates in the extine and cytoplasm of microspore also increased gradually. At the stage of late microspore, Calcium precipitates of the anther wall were further reduced, the remnants of the degenerated tapetum has few calcium precipitates. There were many small vacuoles were found in the cytoplasm of the microspore, Calcium precipitates distributed in vacuole membrane of every small vacuole specifcly, then these small vacuoles merging into the large vacuole, the Calcium precipitates accumulated at the edge of

the large vacuole, implied these calcium precipitates may be associated with the formation of the large vacuole. At the bicellular pollen stage, there were still few calcium precipitates in the anther wall, then the large vacuole of vegetative cell discomposed into many small vacuoles, Calcium precipitates were found in these small vacuoles again, showing that the formation of the large vacuole also has close relationship with Ca^{2+} . At the same time with the disappeared of the large vacuole, many calcium precipitates appeared in the cytoplasm of pollen and the extine. At the mature pollen stage, more calcium precipitates gathered at the extine and germ pore, But as the accumulation of nutriment in the pollen cytoplasm, calcium precipitates decreased significantly in pollen.

In the sterile anther, there were no significant differences of the distribution of Ca^{2+} from sporogenous cell stage to the stage of early microspore compared with fertile anther, At the stage of late microspore, The distribution of Ca^{2+} began to appear obvious abnormal: Firstly, Calcium precipitates of anther wall of lately microspore increased significantly than fertile pollen. Secondly, there were more calcium precipitates gathered at the cytoplasm, nucleus and nucleolus of lately microspor, but few in the fertile pollen at the same place. Then at the bicellular stage, the large vacuole of vegetative cell was not disappeared, and no nutriment accumulated in the cytoplasm, only few calcium precipitates in the cytoplasm and extine. At the mature pollen stage, there were no nutriment in the sterile pollen, the large vacuole still existed and there were few autophagic vacuoles in the cytoplasm.

Keywords: *Triticum astivum* L; Anther Development; Ca^{2+}

第一章 前言

被子植物从雄蕊原基分化开始到形成成熟花粉粒的整个过程中经历了一系列形态结构以及生理生化方面的变化,最终发育到结构简化为三个细胞的雄配子体。如果在这些变化过程中任何一个环节出现异常的话都将会导致花粉不能正常发育,这种现象就叫做雄性不育。雄性不育在植物界中是一种很普遍的现象,已在 43 科, 162 属, 320 个种植物中发现了雄性不育的现象^[1]。雄性不育本身是一种在一系列发育环节中发生的突变,对植物没有好处。但雄性不育可省去去雄程序,在作物的杂种优势利用研究中具有极大潜力。雄性不育的表现花粉正常但花药不能正常开裂,也有时表现为花粉不能萌发。虽然植株自身雄性器官发生突变,但它的雌性部分正常,所以在接受外来花粉后,可受精结实,产生杂种。正是由于雄性不育在农作物杂种优势的利用中具有重要作用,几十年来对雄性不育机理的探索一直吸引了许多科学家的兴趣,特别是在一些农作物中杂种优势已经应用到生产中的情况下,有关导致雄性不育的机理研究就更加迫切了。

对农作物雄性不育方面的研究有多个层次,在分子水平上,可遗传的雄性不育机理是调控花药发育的基因发生了突变;在个体水平上,显现出花药的形态结构异常。然而在确定花药基因发生突变之前,在花药发育的一系列环节中,需要先确定花粉异常发生在哪个环节,因此对雄性不育花药结构的细胞学研究就成了连接雄性不育的分子水平调控机制和个体水平育性结果的中间环节,确定了花粉败育的确切时期和具体的败育方式是寻找导致花药败育的雄性不育基因调控机制的前提。所以对花药细胞结构与功能的研究将是对探索农作物雄性不育机理必不可少研究内容。

1 被子植物花药发育的一般过程

雄蕊是被子植物的雄性生殖器官,雄蕊包括花药和花丝两部分。一般被子植物的花药为棒状,其横切面呈蝶型,含有4个药室,药室外是花药壁,内部含有大量花粉。花器官发生过程中,顶端分生组织分化生成雄蕊原基,在雄蕊原基4个角隅处的表皮下形成孢原细胞。孢原细胞平周分裂可形成两层细胞。外层为初生壁细胞,初生壁细胞进行多次平周分裂形成3层或更多层细胞,连同其外的表皮共同形成花药壁;内层为造孢细胞,以后发育成花粉母细胞,进而发育成花

粉。

1.1 被子植物雄配子体的发育

在一般情况下，由孢原细胞发育而来的造孢细胞发育为小孢子母细胞。小孢子母细胞的形态结构明显区别于周围的药壁细胞，细胞内无明显的液泡，细胞质浓厚，细胞核较大，细胞体积也较大，小孢子母细胞的壁由薄纤维素壁逐步发育成厚的胼胝质壁^[2]。小孢子母细胞经减数分裂产生四个单倍体细胞，即四分体小孢子。最初四个小孢子被共同的胼胝质壁包围，称为四分体。小孢子四分体时期通常较为短暂，胼胝质壁溶解后，四个小孢子即分散形成游离小孢子，被释放到药室中。也有一些植物在小孢子形成后始终保持四分体的形态，称为复合花粉，如杜鹃科、夹竹桃科及兰科的一些植物^[3]。

从四分体释放出来的早期小孢子体积较小，无明显液泡，细胞核位于中央，此时小孢子也被称为单核中位小孢子。随着小孢子的发育，小孢子体积增大的同时，细胞质也开始发生液泡化，逐渐形成一个中央大液泡，将细胞核挤到边缘部位，使得小孢子呈现出明显的极性。晚期小孢子也常称为单核靠边小孢子。小孢子极性的发生为其不等分裂创造条件，使小孢子转向雄配子体发育。

随后小孢子继续发育到一定程度后，进行了一次不等的有丝分裂，形成了一个大的营养细胞和一个小的凸透镜状的生殖细胞。营养细胞含有大部分细胞质和细胞器，生殖细胞中只有少量细胞器。生殖细胞最初紧贴花粉壁，以后生殖细胞向营养细胞中移动，在移动的过程中，不仅生殖细胞的形状发生变化，生殖细胞的壁也逐渐消失，最后成为裸细胞，浸没在营养细胞中。生殖细胞脱离花粉壁及形状变化的具体机制还不清楚，推测在后者中微管起重要作用^[4]。营养细胞接受了来自小孢子的大量细胞质和细胞器，随着大液泡的消失和细胞质的增加，细胞质内各种细胞器的数量也有所增加，如核糖体、线粒体、高尔基体和内质网。随着不断发育，营养细胞逐渐积累营养物质，供以后花粉萌发和花粉管生长所用。

开花时的成熟花粉粒可分二胞型花粉和三胞型花粉两种类型。二胞花粉由一个营养细胞和一个生殖细胞构成，生殖细胞在萌发的花粉管中分裂形成两个精细胞，如烟草^[5]、韭菜^[6]等植物的花粉。还有的被子植物花粉在萌发前生殖细胞就已分裂形成两个精细胞，成熟的花粉则由一个营养细胞和这两个精细胞构成，形成三胞型花粉，如太子参^[7]、小麦^[8]等的花粉。在成熟的花粉中富含淀粉粒和脂

类等营养物质。

1.2 被子植物花药壁的发育

花药壁是植物器官中最复杂的保护结构。初生造孢细胞分裂形成的花药壁通常由外向内分为表皮、药室内壁、中层和绒毡层四层细胞。四层药壁细胞虽然紧密相邻，但其来源以及细胞的结构和功能呈现出很大差异。

表皮细胞起源于花药原基，经过垂周分裂适应花药原基增大的表面积。在花药的发育过程中，表皮逐渐扩展成扁平形，在表面形成特殊的细胞壁，对花药具有保护功能。由孢原细胞分化形成的初生周缘细胞进一步分裂形成药室内壁、中层和绒毡层三层细胞。药室内壁细胞通常只有一层，外切向壁紧贴着表皮。药室内壁细胞一般高度液泡化，常贮有淀粉粒，有的含叶绿体，有的含脂体。大多数植物的药室内壁细胞在发育晚期其内切向壁、径向壁会出现纤维状的加厚带，因此，药室内壁也称为“纤维层”。这是药室内壁细胞的特征。这种特殊的结构可能与花药的开裂有关。

中层细胞位于药室内壁细胞的下方，通常由一到三层细胞组成，细胞内含有淀粉或其他储藏物质。中层随着花药的发育中途解体，成熟的花药壁没有中层细胞。目前对花药中层细胞的功能还不清楚。

绒毡层细胞是花药壁的最内层体细胞组织，通常也只有一层。其细胞较大，细胞质浓厚，含有核糖体、线粒体、造油体等细胞器。绒毡层也在花药发育过程中退化、解体，因此对花粉的早期发育有重要影响。绒毡层可分为分泌绒毡层和变形绒毡层。前者在发育过程中在原位解体，后者在发育后期发生内切向壁和径向壁的溶解，原生质体逸出，分散在小孢子之间，彼此融合成多核的原生质团。绒毡层细胞内营养物质丰富，对小孢子和花粉的发育具有重要的作用。另外，绒毡层细胞与四分体胼胝质壁的溶解，花粉外壁的合成、花粉与柱头的识别等也有非常密切的关系。因此，绒毡层发育或者解体过程中出现异常变化就会导致花粉的败育。当花粉成熟时，绒毡层解体退化，已有研究证明，绒毡层细胞的死亡，很可能就是细胞程序性死亡（PCD）^[9]，现已克隆了一些与绒毡层细胞程序性死亡相关的基因^[10]，使人们对绒毡层细胞的降解机制有了更深入的理解，但其调控机制还需要深入研究。

2 植物雄性不育的类型

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.